

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3048883 A1**

⑳ Aktenzeichen:
㉔ Anmeldetag:
㉕ Offenlegungstag:

P 30 48 883.6
23. 12. 80
15. 7. 82

⑤① Int. Cl. 3:
C08F2/22
C 08 F 20/32
C 12 Q 1/00
C 12 N 11/08
C 07 G 7/00
G 01 N 33/54

⑦① Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE;
Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,
11142 Praha, CS

⑦④ Vertreter:

Grußdorf, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Daum, M., Dr.-Ing.,
Pat.-Ass., 6800 Mannheim

⑦② Erfinder:

Batz, Hans-Georg, Dr.rer.nat., 8132 Tutzing, DE; Tanswell,
Paul, Dr.phil., 8033 Planegg, DE; Baier, Manfred, Dr.rer.nat.,
8134 Pöcking, DE; Bouchal, Karel, Dr.-Ing., 150 00 Prag, CS;
Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.-Ing., 160 00 Prag, CS; Svec,
Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebek, CS; Zirkova, geb. Hrubá,
Eva, 147 00 Praha, CS; Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.-Ing., 160 00
Praha, CS; Svec, Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebek, CS;
Zirkova, geb. Hrubá, Eva, Dr.-Ing., 147 00 Praha, CS

⑤④ **Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung**

DE 3048883 A1

BEST AVAILABLE COPY

DE 3048883 A1

23.12.80

Patentansprüche

- 1 1. Aus einem Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne
5 jeden Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar sind.
2. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer (im Falle eines
10 Homopolymerisats) bzw. ein Teil der Monomeren (im Falle eines Copolymerisats) ein mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im Molekül enthaltendes Epoxid ist.
-
- 15 3. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren eine Epoxy-alkylen-Verbindung bzw. ein Glycidylester oder Glycidyläther ist.
- 20 4. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren Glycidylacrylat oder Glycidylmethacrylat ist.

20 10 80
- 2 -

- 1 5. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche
1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder
Copolymerisat mit Hilfe eines zwei- oder mehrfach unge-
sättigten Vernetzungsmittels vernetzt ist.
- 5 6. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche
1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen
monodisperse Kügelchen sind und einen untereinander
nahezu gleich großen Durchmesser von zwischen 0,15
10 und 1,5 μm besitzen.
- 15 7. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche
1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder
Copolymerisat endständige Hydroxyl-, primäre oder sekun-
däre Amino-, Thiol-, Aldehyd- oder Carboxylgruppen
aufweist.
- 20 8. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche
1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einpoly-
merisierte Farbstoffe oder fluoreszierende Verbin-
dungen enthalten.
- 25 9. Verfahren zur Herstellung der hydrophilen Latex-
partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch
gekennzeichnet, daß ein in Wasser schwerlösliches
Monomer oder verschiedene in Wasser schwerlösliche
Monomere in Wasser dispergiert und unter Ausschluß
von Sauerstoff, beispielsweise in einer Inertgas-
atmosphäre, durch Emulsionspolymerisation in Anwe-
senheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden
30 Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines Emulga-
tors, Stabilisators oder Netzmittels homo- oder
copolymerisiert werden.
- 35

ORIGINAL INSPECTED

- 30

26 25.12.80
4.

- 1 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch
gekennzeichnet, daß der endständige Epoxid-Gruppen
enthaltende Latex noch während oder nach der Emul-
5 sionspolymerisation mit wäßriger Alkalihydroxid-
lösung, wäßriger Ammoniaklösung, mit einem primären
Amin, einem Hydrazin oder einem Sulfid, einer Hydrolyse,
Ammonolyse, Aminolyse oder Thiolyse unterworfen wird,
so daß sich endständige Hydroxyl-, gegebenenfalls
10 mono- oder disubstituierte Aminogruppen oder Thiol-
gruppen bilden, welche gegebenenfalls anschließend
enzymatisch oder mit Periodat bzw. Periodsäure in
Aldehydgruppen übergeführt werden.
- 15 19. Diagnostisches Mittel, enthaltend hydrophile Latex-
partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 als
Träger und an diesen Träger direkt oder über ein
Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen.
- 20 20. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 19, dadurch ge-
kennzeichnet, daß es als biologisch und/oder immuno-
logisch aktive Substanzen Peptide, Proteine, Enzyme,
Hormone, Vitamine, Antigene, Antikörper oder Mikro-
organismen enthält.
- 25 21. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung
von Thyroxin, dadurch gekennzeichnet, daß es als
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanz
einen Thyroxin-Antikörper enthält.
- 30 22. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung
von Human-Thyreotropin, dadurch gekennzeichnet, daß
es als biologisch und/oder immunologisch aktive Sub-
stanz einen Human-Thyreotropin-Antikörper enthält.

23.12.80

5. 2350

Tschechoslowakische Akademie der Wissen-
schaften

Narodni 3, 111 42 Prag

Boehringer Mannheim GmbH

Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31

Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren
Herstellung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft hydrophile Latexpartikel, ein Ver-
fahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Trä-
germaterial für biologisch und/oder immunologisch aktive
Substanzen in diagnostischen Mitteln.

5

10

Für die Agglutination von Antigen-Antikörper-Komplexen,
die in der Immunologie im Rahmen vieler diagnostischer
Bestimmungen ausgenutzt wird, weil sie besonders schnell
und einfach durchgeführt und häufig mit bloßem Auge beob-
achtet werden kann, verwendet man seit langem hydrophobe
Latexpartikel als Träger von immunologisch aktiven Substan-
zen, beispielsweise von Antikörpern. Diese hydrophoben
Latexpartikel bestehen meist aus Polystyrolhomo- oder
Copolymerisaten, beispielsweise Styrol-Butadien-Copolymeri-

25-12-80

- 1 saten oder Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymerisaten
(ABS) und werden durch Emulsionspolymerisation herge-
stellt.
- 5 Bei der seit langem bekannten Emulsionspolymerisation
sind im allgemeinen vier Komponenten zugegen: ein in
Wasser schwerlösliches Monomer oder ein Gemisch ver-
schiedener in Wasser schwerlöslicher Monomere, Wasser,
ein Emulgator und ein wasserlöslicher Initiator. Das
10 Monomere wird dabei durch den Emulgator in Form feiner
Tröpfchen emulgiert, wobei sich durch Zusammenlagerung
von mehreren Emulgatormolekülen u.a. größere Micellen
bilden, die teilweise leer und teilweise mit Monomermole-
külen gefüllt sind; letzteres wird als "Solubilisierung"
15 des Monomeren bezeichnet. Der wasserlösliche Initiator
bildet Radikale, die die Polymerisation sowohl von ein-
zelnen Monomermolekülen in der Wasserphase als auch in
den monomergefüllten Micellen sowie in den Monomertröpf-
chen auslösen bzw. aktivieren können. Tatsächlich findet
20 aber die Polymerisation überwiegend in den gequollenen
Micellen statt, da einerseits die Monomerkonzentration
in den Micellen wesentlich größer ist als in der Umge-
bung einzelner gelöster Monomermoleküle und andererseits
die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von Micellen wegen
25 ihrer im Vergleich zur Zahl der Monomertröpfchen wesent-
lich größeren Anzahl beträchtlich höher ist. Der Durch-
messer der gefüllten Micellen nimmt während der Polyme-
risation zu, bis diese schließlich in kugelförmige Latex-
teilchen übergehen. Die Emulgatormoleküle der nichtakti-
vierten Micellen und diejenigen aus der Oberfläche der
30 verbrauchten Monomertröpfchen bedecken die Oberfläche
der Latexteilchen und tragen so zur Stabilisierung der
entstehenden Polymerdispersion bei.
- 35 Diese nach dem bekannten Verfahren unter Zusatz eines
Emulgators oder Emulsionsstabilisators, welcher beispiele-
weise ein Tensid oder Netzmittel sein kann, hergestellten
Latices haben folgende Nachteile, die insbesondere ihre

ORIGINAL INSPECTED

23.12.80
3.7.

- 1 Verwendung als Träger von immunologisch aktiven Substanzen stören und ihren Einsatz in kontinuierlichen Lösungsmesssystemen verhindern:
- 5 1. An der hydrophoben Oberfläche der Latexpartikel werden neben den gewünschten immunologisch aktiven Substanzen, beispielsweise Antikörpern, unspezifisch eine Vielzahl anderer Serumbestandteile gebunden;
- 10 2. die nur adsorptiv, nicht kovalent gebundenen immunologisch aktiven Substanzen können sich während der Messung im Verlauf eines diagnostischen Tests wieder ablösen;
- 15 3. die bei der Emulsionspolymerisation als Emulgator oder Stabilisator verwendeten Tenside können die Struktur und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine zerstören, weil sie in die wäßrige Lösung diffundieren;
- 20 4. beim Entfernen der sie stabilisierenden Tenside koaguliert die Latexsuspension und auch beim Zentrifugieren wird die Stabilisierung gebrochen. Der hierbei entstehende Niederschlag kann nur schwer oder überhaupt nicht mehr zum vorherigen Zustand resuspendiert werden.
- 25
- Zur Vermeidung dieser Nachteile wurden bereits verschiedene Vorschläge gemacht, die aber immer nur einen Teil der vorstehend genannten Probleme lösen konnten:
- 30 So sind aus der DE-AS 22 03 377 hydrophobe Latexpartikel mit einer Teilchengröße von 0,01 bis 0,9 µm aus carboxylierten ABS-Copolymeren und carboxylierten Styrol-Butadien-Copolymeren bekannt, die als serologisch inerte Träger für biologisch aktive Proteine verwendet werden
- 35 können, wobei die Proteine kovalent an den Träger gebunden werden, und zwar über die in den Latex eingeführten Carboxylgruppen, unter Ausbildung von Amidbindungen.

28.12.84
A. P.

- 1 Aus der DE-OS 28 12 845 sind hydrophobe Latices mit einer
Teilchengröße von 0,05 bis 1 μm aus ABS-Copolymeren be-
kannt, bei denen der Latex ebenfalls mit Carboxylgruppen
5 modifiziert und mit einer reaktiven Seitenkette konden-
siert ist, so daß immunologisch aktive Substanzen eben-
falls kovalent gebunden werden können.

Mit diesen bekannten hydrophoben Latices wird zwar das
Problem Nr. 2 (s.o.) gelöst, alle übrigen Nachteile
10 bleiben aber unverändert bestehen.

Man hat deshalb auch schon versucht, anstelle hydrophober
Latices hydrophile Gele als Träger für immunologisch
aktive Substanzen zu verwenden. Da hydrophile Gele keine
15 oder nur sehr geringe Adsorptionseigenschaften haben,
andererseits aber die kovalente Bindung von Proteinen
an solche Gele bekannt ist, hat man "Mikrogele" vorge-
schlagen, die aufgrund ihrer Herstellungsweise und ihres
Teilchendurchmessers ebenso gut als "Latices" bezeichnet
20 werden könnten. Solche hydrophilen Latices sind beispiele-
weise aus der US-PS 4 138 383 bekannt. Sie bestehen aus
kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von weniger
als 0,35 μm , die unter den Bedingungen einer durch freie
Radikale initiierten wäßrigen Emulsionspolymerisation
25 hergestellt werden, wobei als Monomere Acrylamide, Acryl-
säure, Methacrylsäure oder Acrylate verwendet werden.
Als Emulgatoren werden beispielsweise Metallseifen ver-
wendet. An die so erhaltenen hydrophilen Mikrogele werden
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen in an
30 sich bekannter Weise über Carbodiimid- oder Glutaraldehyd-
Brücken kovalent gebunden. Damit sind zwar die Probleme
Nr. 1 und 2 (s.o.) gelöst worden, nicht aber die Probleme
Nr. 3 und 4, da die Emulsionspolymerisation nach wie vor
unter Zusatz eines Emulgators oder Stabilisators durch-
35 geführt werden muß.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, hydrophile
Latexpartikel, ein Verfahren zu deren Herstellung und

ORIGINAL INSPECTED

23.12.80
5/9

- 1 ein diese enthaltendes diagnostisches Mittel zu schaffen,
mit denen es gelingt, alle vier oben genannten Nachteile
zu vermeiden. Der Erfindung liegt also insbesondere die
Aufgabe zugrunde, hydrophile Latexpartikel zu schaffen,
5 die in der Lage sind, biologisch und/oder immunologisch
aktive Substanzen kovalent zu binden, die die Struktur
und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine
nicht beeinträchtigen, deren Stabilisierung beim Zentri-
fugieren nicht gebrochen wird und die sich koagulieren
10 und anschließend wieder leicht resuspendieren lassen.

- Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch aus einem
Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen
Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel gelöst, die
15 dadurch gekennzeichnet sind, daß sie durch Emulsionspoly-
merisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale
bildenden Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines
Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar
sind.

- 20 Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung be-
steht mindestens ein Teil der Monomeren, aus denen die
hydrophilen Latexpartikel aufgebaut sind, aus einem
mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im
25 Molekül enthaltenden Epoxid.

- Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß entgegen der
in Fachkreisen seit langem herrschenden Meinung, die auch
in dem eingangs zitierten Stand der Technik zum Ausdruck
30 gebracht wird, der Zusatz eines Emulgators, Stabilisators
oder eines Netzmittels zur Durchführung der Emulsions-
polymerisation gar nicht erforderlich ist. Damit entfällt
aber die meist sehr schwierige und umständliche Entfernung
von Emulgatorresten aus den polymeren Latexpartikeln, die
35 bisher zwingend erforderlich war, weil die als Emulgatoren
verwendeten Metallseifen oder Tenside aus den Latexparti-
keln diffundierten und die biologische Aktivität der an
die Latexpartikel kovalent gebundenen Proteine beein-
trächtigten oder vollkommen zerstörten.

1 Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung von
mindestens eine polymerisierbare Doppelbindung enthalten-
den Glycidyl-Verbindungen als Monomer erwiesen. Die
Struktur dieser Verbindungen weist in der polymerisier-
5 baren Doppelbindung einen hydrophoben und in der Epoxid-
Gruppe, dem Oxiran-Ring, zugleich einen hydrophilen Teil
auf. Die erfindungsgemäß entstehenden Latexsuspensionen
koagulieren nicht trotz Abwesenheit jeglichen Emulgators,
Stabilisators oder Netzmittels. Die Stabilisierung der
10 Latexsuspension wird auch beim Zentrifugieren nicht ge-
brochen. Da die endständigen Epoxidgruppen für verschie-
dene Umsetzungen (Hydrolyse, Ammonolyse, Aminolyse, Kon-
densationen) sehr leicht zugänglich sind, müssen die
Epoxidgruppen die Oberfläche der monodispers verteilten
15 Latexkügelchen so bedecken, daß sie in die Wasserphase
hinaus orientiert sind.

Als Monomere werden erfindungsgemäß vorzugsweise Glycidyl-
methacrylat, Glycidylacrylat, Glycidylvinyläther, Glyci-
20 dylvinylphthalat und 3,4-Epoxybut(1)en verwendet. Es kann
dabei ausschließlich eines dieser Monomere verwendet
werden, so daß die entstehenden hydrophilen Latexpartikel
ein Homopolymerisat darstellen, es kann aber auch ein
Gemisch dieser Monomere copolymerisiert werden.

25 Zur Steuerung des Gehaltes an Epoxidgruppen können mit
einer oder mehreren der genannten Glycidylverbindungen
auch andere Monomere copolymerisiert werden, beispiels-
weise Styrol, Diene, Acrylamide, Methacrylamide, Alkyl-,
30 Hydroxyalkyl- und Aminoalkylacrylate, Alkyl-, Hydroxy-
alkyl- und Aminoalkylmethacrylate, Vinyläther, Vinylester,
N-Vinylpyrrolidon und dergleichen.

Es kann auch in Gegenwart monomerer, polymerisierbarer
35 Derivate von Farbstoffen oder fluoreszierenden Verbindungen,
z.B. Fluorescein, polymerisiert werden. Auf diese Weise
werden farbige bzw. fluoreszierende Latexpartikel erhalten,
die sich zum Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern in
menschlichen oder tierischen Geweben eignen. Diese Nachweis-

ORIGINAL INSPECTED

- 11.
- 1 methode eignet sich besonders vorteilhaft zur Herstellung
von Gewebeschnitten in der Histologie. Als monomere, poly-
merisierbare Derivate werden vorzugsweise Farbstoffe bzw.
fluoreszierende Verbindungen eingesetzt, in die in an sich
5 bekannter Weise Methacryl- bzw. Acryl-Reste eingebaut
worden sind.

- Um die Schwerlöslichkeit der entstehenden Latexpartikel
in Wasser zu erhöhen, können während der Emulsionspoly-
10 merisation übliche Vernetzungsmittel zugesetzt werden,
beispielsweise Alkylen- oder Hydroxyalkylendiacrylate,
Alkylen- oder Hydroxyalkylen dimethacrylate, Alkylenbis-
acrylamide oder Alkylenbisacrylmethacrylamide, Divinyl-
benzol und dergleichen.

- 15 Als Initiator kann jeder üblicherweise für die Emulsions-
polymerisation verwendete wasserlösliche Initiator ver-
wendet werden; erfindungsgemäß werden vorzugsweise
Peroxodisulfate, Peroxoborate, Wasserstoffperoxid oder
20 geeignete Redoxsysteme eingesetzt.

- Das erfindungsgemäße Verfahren der emulgatorfreien Emul-
sionspolymerisation von einem oder verschiedenen in
Wasser schwerlöslichen Monomeren zur Herstellung der
25 hydrophilen Latexpartikel ist gegenüber Luftsauerstoff
bzw. freiem Sauerstoff überhaupt empfindlich. Der Sauer-
stoff muß deshalb sehr sorgfältig aus allen Polymerisa-
tionskomponenten und Gefäßen durch gründliches Auskochen,
durch Destillation unter Inertgasatmosphäre oder durch
30 Hindurchleiten von Stickstoff, Argon oder einem anderen
Inertgas entfernt werden.

- Die emulgatorfreie Emulsionspolymerisation wird erfin-
dungsgemäß vorzugsweise mit einem Flottenverhältnis,
35 bezogen auf die Volumina, zwischen Wasser- und Monomeren-
phase von 8 : 1 bis 16 : 1 durchgeführt.

Die Konzentration des in der wäßrigen Phase gelösten
Initiators beträgt vorzugsweise zwischen 0,5 und 1,5 g/l

- 1 und die Konzentration des Epoxids in der Monomerenphase beträgt vorzugsweise 1 bis 100 Gew. %.

5 Die Emulsionspolymerisation wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 0 bis 80°C durchgeführt. Die Temperatur ist abhängig vom gewählten Initiator: bei Verwendung von Kaliumperoxodisulfat arbeitet man vorzugsweise bei 60 bis 70°C. Ebenfalls abhängig von der Wahl des Initiators ist die Reaktionsdauer, die zwischen 5 und 40 Stunden
10 beträgt.

Die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel sind streng kugelförmige, monodispers verteilte und untereinander annähernd gleich große Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 0,15 bis 1,5 µm.
15

Die hydrophilen Latexpartikel können nach beendeter Emulsionspolymerisation noch Reste nichtauspolymerisierter Monomere enthalten, die durch Wasserdampfdestillation
20 oder Dialyse beseitigt werden können. Auch hierbei kommt die besonders vorteilhafte Eigenschaft der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel zum Tragen, die darin besteht, daß die Latexpartikel durch Zentrifugieren sedimentiert werden können, ohne daß die Stabilisierung
25 gebrochen wird, so daß sie anschließend wieder redispersiert werden können. Auf diese Weise kann der erfindungsgemäße Latex durch mehrfaches Zentrifugieren und Dekantieren auf einfache Weise gereinigt werden.

30 Die endständigen freien Epoxidgruppen des erfindungsgemäßen Latex sind gegenüber den unterschiedlichsten chemischen Substanzen hoch reaktionsfähig und können deshalb leicht hydrolysiert, mit Periodat oder Periodsäure zur Aldehydgruppe oxidiert, mit Ammoniak, primären Aminen,
35 Diaminen oder Hydrazinen zu prim. od. sek. Aminogruppen umgesetzt oder mit Hilfe anderer bekannter Reaktionen modifiziert werden. Die Emulsion des erfindungsgemäßen Latex weist trotz Fehlens eines Emulgators eine derart hohe Stabilität auf, daß die Modifizierung der Epoxidgruppen

BAD ORIGINAL

1 gewünschtenfalls auch schon während der Emulsionspolymeri-
sation durchgeführt werden kann, so daß bereits aus der
Polymerisationsreaktion ein Latex entsteht, der an der
Oberfläche beispielsweise mit primären Aminogruppen
5 modifiziert ist. Die modifizierten oder derivatisierten
Epoxidgruppen stehen dann für die "Kupplung" mit biolo-
gisch und/oder immunologisch aktiven Proteinen, die somit
kovalent an die als Träger fungierenden hydrophilen Latex-
partikel gebunden werden, zur Verfügung.

10 Die eingangs genannte Aufgabe wird somit weiter durch die
Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel
als serologisch inerte Träger für biologisch und/oder
immunologisch aktive Substanzen gelöst, beispielsweise
15 als Träger für Peptide, Proteine, Enzyme, Hormone, Vita-
mine, Antigene, Antikörper und Mikroorganismen.

Gegenstand der Erfindung ist somit weiterhin ein diagno-
stisches Mittel, enthaltend erfindungsgemäße hydrophile
20 Latexpartikel als Träger und an diesen Träger direkt oder
über ein Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen der
vorstehend genannten Art.

25 Die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel eignen sich
besonders zum Einsatz in Radioimmuno-(RIA), Enzymimmuno-
(EIA) und sogenannten ELISA(enzymelinked immunosorbent
assay)-Tests.

30

35

14.
20.10.801 Beispiel 1

In 80 ml destilliertem Wasser werden 0,08 g Kaliumperoxo-
disulfat ($K_2S_2O_8$) gelöst und dadurch von Luftsauerstoff
5 befreit, daß 30 Minuten lang Stickstoff hindurchgeleitet
wird. Gleichzeitig werden 10 ml Glycidylmethacrylat auf
dieselbe Weise von Luftsauerstoff befreit. Beide Kompo-
nenten werden in einen Glasreaktor verbracht und weitere
10 Minuten lang mit Stickstoff behandelt. Danach wird
10 der Reaktor geschlossen und die Reaktion unter ständigem
Rühren 6 Stunden lang bei einer Temperatur von $65^\circ C$ durch-
geführt. Nach dieser Zeit beträgt der Umsatz 98%. Das
Reaktionsprodukt ist ein Latex aus kugelförmigen, mono-
dispers verteilten Polyglycidylmethacrylat-Partikeln mit
15 einem Durchmesser von 0,44 μm .

Beispiel 2

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden 160 ml destillier-
20 tes Wasser, in dem 0,08 g $K_2S_2O_8$ gelöst sind, und 10 ml
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und
85 Gew.% Styrol getrennt vom Sauerstoff befreit und 6
Stunden lang unter ständigem Rühren bei einer Temperatur
von $65^\circ C$ miteinander umgesetzt. Danach beträgt der Umsatz
25 71,6%. Die nichtauspolymerisierten Restmonomeren werden
durch Wasserdampfdestillation beseitigt. Die entstehenden
monodispersen copolymeren Latexpartikel haben einen Durch-
messer von 0,22 μm .

30 Beispiel 3

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von
0,1 g $K_2S_2O_8$ in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und 85 Gew.%
35 Vinylacetat miteinander umgesetzt. Der Umsatz beträgt
80%. Die Restmonomeren werden durch Wasserdampfdestilla-
tion entfernt. Der entstehende Latex besteht aus mono-
dispersen, kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser

15.
20.10.80

3048883

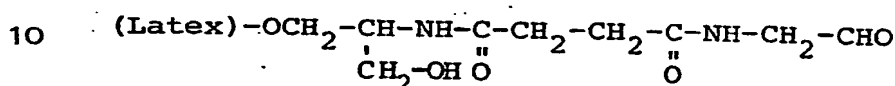
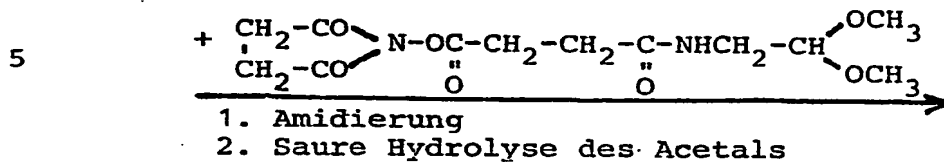
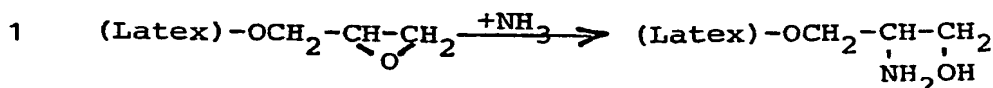
- 1 von 0,16 μm .
- 100 ml des so hergestellten Latex werden mit 100 ml
0,1 M-NaOH-Lösung vermischt und bei einer Temperatur von
5 etwa 25°C 24 Stunden stehengelassen. Auch während und
nach der Hydrolyse bleibt die Stabilität des Latex er-
halten. Die Emulsion wird zentrifugiert, der Überstand
abgegossen und die feste Phase wieder in Wasser redisper-
giert. Das Zentrifugieren und Redispersieren wird zweimal
10 wiederholt. Die entstehende neutrale Emulsion wird mit
1 M-H₂SO₄ auf einen pH-Wert von 3 gebracht und mit Period-
säure in einer den Epoxidgruppen äquivalenten Menge ver-
setzt. Die Oxidation wird bei 25°C etwa 24 Stunden lang
durchgeführt; anschließend werden die nichtumgesetzten
15 niedermolekularen Stoffe durch Dialyse entfernt. Die
modifizierten Latexpartikel der stabilen Emulsion ent-
halten 2,8 Gew.% oder 0,97 mMol/g an Aldehydgruppen.

Beispiel 4

- 20 Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von
0,1 g K₂S₂O₈ in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und
85 Gew.% Isopren bei einer Temperatur von 65°C 24 Stunden
25 lang umgesetzt. Der Umsatz beträgt 76%. Die Restmonomeren
werden anschließend durch Wasserdampfdestillation entfernt,
wobei stabile, monodispers verteilte kugelförmige Latex-
partikel mit einem Durchmesser von 0,25 μm entstehen.
- 30 100 ml dieser Emulsion werden anschließend mit 100 ml
wässriger Ammoniaklösung (25%ig) versetzt und 24 Stunden
lang bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei die
Epoxidgruppen durch Ammonolyse in Aminogruppen übergehen.
Das Reaktionsprodukt wird anschließend mit Periodsäure
35 behandelt, wobei ein Latex entsteht, der 4,5 Gew.% oder
1,55 mMol/g an Aldehydgruppen enthält.

13. 10. 80

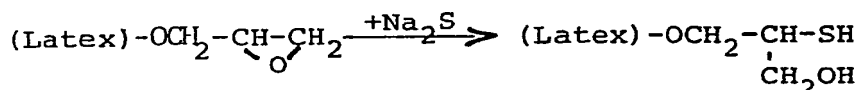
17.

Beispiel 8

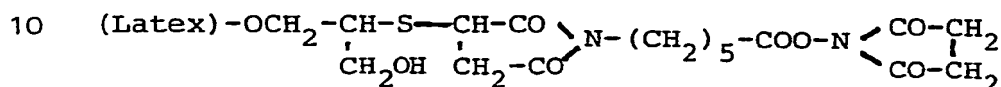
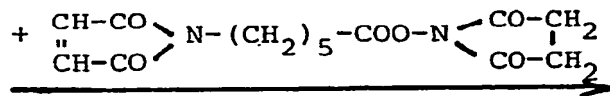
20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension
werden mit 10 ml konzentrierter Ammoniak-Lösung 20 Std.
bei Raumtemperatur gerührt und 48 Std. gegen fließendes
Wasser dialysiert. Die erhaltene Suspension wird abzen-
trifugiert. Der Stickstoff-Gehalt der Trockensubstanz
liegt danach bei etwa 1 %, was einer Aminierung von etwa
jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevorzugten
Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren Deri-
vatisierungsgrad entspricht. Die abzentrifugierte Fest-
substanz wird mit 20 ml 0,1 N Natronlauge wieder aufgenommen.
Dazu werden unter Rühren 1,5 g Bernsteinsäurehydroxysuccinimid-
ester-amidoacetaldehyd-acetal (gelöst in 6 ml Dimethylformamid)
getropft. Die entstehende Suspension wird noch 3 Std. gerührt,
danach mit 1N Salzsäure auf pH 3 gebracht und dann 12 Std.
gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

14. 12. 80
18.

1 Beispiel 9



5



20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension
 15 werden mit 0,5 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ versetzt und 2 Tage bei Raum-
 temperatur gerührt. Anschließend wird gegen fließendes
 dest. Wasser dialysiert, bis die Suspension geruchsfrei
 ist, dann wird die Suspension abzentrifugiert. Die Trocken-
 substanz enthält etwa 2 % Schwefel, was einer Derivatisierung
 20 etwa jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevor-
 zugten Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren
 Derivatisierungsgrad entspricht.

Das abzentrifugierte Produkt wird mit 1 g 6-Maleinimido-
 hexansäure-hydroxysuccinimidester (gelöst in 6 ml Dimethyl-
 25 formamid) versetzt, 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt
 und dann 12 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

Beispiel 10

30

Bildung von Latex-gamma-Globulin-Konjugaten

1 ml gamma-Globulin-Lösung (enthaltend 56,6 mg Protein)
 werden mit jeweils 20 ml einer

35

27.10.80
15.19.

- 1 a) nach Beispiel 1 hergestellten,
b) nach Beispiel 7,
c) nach Beispiel 8 und
5 d) nach Beispiel 9 derivatisierten

5 Latex-Suspension versetzt und 12 Std. bei Raumtemperatur
dialysiert. Die verbleibenden Suspensionen werden abzen-
trifugiert. Anschließend wird im Überstand freies Protein
10 bestimmt. Aus dem gefundenen Wert läßt sich der an die
Latex-Teilchen gebundene Anteil berechnen. Danach enthält:

Ansatz a	8 mg gamma-Globulin, gebunden
Ansatz b	43 mg gamma-Globulin, gebunden
Ansatz c	15 mg gamma-Globulin, gebunden
15 Ansatz d	19 mg gamma-Globulin, gebunden

Beispiel 11

Bildung von Latex-IgG-Konjugaten

20 Wie in Beispiel 10 beschrieben werden aus einer IgG-Lösung
und verschiedenen Latex-Suspensionen Latex-IgG-Konjugate
hergestellt. Durch Antikörper-Komplexbildung wird die
Beladung der Latex-Partikel mit IgG-Molekülen nachgewiesen.

25 Im folgenden werden zwei diagnostische Mittel als
Beispiele für die Verwendung der erfindungsgemäßen hydro-
philen Latexpartikel beschrieben, und zwar zur immunolo-
gischen Bestimmung von Thyroxin (T_4) mit Hilfe von T_4 -
30 Antikörpern aus Anti- T_4 -Serum vom Schaf und zur Bestimmung
von Humanthyr(e)otropin (TSH) im Serum mit Hilfe der
Doppelantikörper-Trenntechnik.

15. 10. 80
20.1 Beispiel 12

5 Verwendung von Homopolyglycidylmethacrylat-Latexpartikeln
als Träger für Anti-T₄-Serum vom Schaf; diagnostisches
Mittel zur Durchführung eines T₄-ELISA

10 Für die Bestimmung von Thyroxin (T₄) mittels ELISA wurden
zunächst T₄-Antikörper aus einem Anti-T₄-Serum vom Schaf
an die erfindungsgemäßen hydrophilen Homopolyglycidyl-
methacrylat-Latexpartikel kovalent gebunden, indem letztere
nach einem der Beispiele 7-9 derivatisiert und in Analogie
zu den Beispielen 10 und 11 mit den T₄-Antikörpern umge-
setzt werden. Die so erhaltenen solid-face-Antikörper
15 stellen das erste Reagens für den Test dar. Als zweites
Reagens wird T₄ in an sich bekannter Weise mit einem hier-
für geeigneten Enzym, beispielsweise Peroxidase (POD) oder
β-Galaktosidase (β-Gal), markiert, d.h. zu einem Enzym-
konjugat "gekoppelt". Als Enzym wird im vorliegenden Bei-
spiel β-Gal verwendet. Das dritte Reagens ist die einen
20 unbekannten Gehalt an T₄ aufweisende Probe und das vierte
Reagens ein übliches Substrat für die β-Gal des Enzym-
konjugats, und zwar im vorliegenden Falle Nitrophenyl-β-
galactosid in Tris-HCl-Puffer, pH 7.3.

25 Das Testprinzip beruht auf dem Ablauf folgender drei
Reaktionen:

1. Der immunologischen Reaktion zwischen den an die
hydrophilen Latexpartikel kovalent gebundenen T₄-
30 Antikörpern einerseits und dem enzymmarkierten T₄
("Enzymkonjugat") und dem in der Probe enthaltenen
freien T₄ andererseits. Bei dieser Reaktion findet
also eine kompetitive Bindung zwischen den solid-
face-Antikörpern, dem Enzymkonjugat und dem T₄ der
35 Probe statt.

17.03.80
21.

- 1 2. Der B/F-Trennung (B=bound, F=free). Es handelt sich
hier also um eine Trennung von gebundenem (bound)
und ungebundenem (free) Enzymkonjugat. Diese Trennung
kann in vorteilhafter Weise durch Zentrifugieren oder
5 durch Dialyse, beispielsweise gegen Wasser oder eine
geeignete Pufferlösung, erreicht werden.
3. Der Enzymnachweisreaktion, die zwischen dem Enzym-
konjugat und dem üblicherweise verwendeten, für das
eingesetzte Enzym spezifischen, Substrat abläuft und
10 die kolorimetrisch oder auf andere bekannte Weise ver-
folgt werden kann. Die Enzymaktivität kann entweder
im Zentrifugat (free-Anteil) oder in dem resuspendierten
Niederschlag (bound-Anteil) erfolgen.

15

Versuchsdurchführung

- Die in oben angegebener Weise hergestellte Latex-anti-T₄-
Suspension wird im Wasser oder Pufferlösung im Verhältnis
20 1:1000 verdünnt. 0,5 ml dieser Suspension werden mit 100 µl
einer T₄-Serum-Standardlösung mit verschiedenem, jeweils
bekanntem T₄-Gehalt und 100 µl einer T₄-β-Gal-Konjugat-
Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten
bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation
25 wurde ein Ansatz ständig geschüttelt, während ein zweiter
Ansatz mit gleichem T₄-Standardgehalt lediglich stehen
gelassen wurde. Danach wurde jeweils die Suspension zen-
trifugiert und der Überstand, in dem sich die F-Phase
befindet, abgetrennt. Die B-Phase, also das an die solid-
30 face-Antikörper gebundene T₄-β-Gal-Konjugat, befindet
sich im Niederschlag. Zur Bestimmung der Enzymaktivität
wird dieser in überschüssiger Substrat-Lösung, bestehend
aus

- 35 450 mg/l p-Nitrophenyl-β-galactosid (Fa. Sigma)
100 mM Natriumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Tris-Puffer/HCl
0,4 % (V/V) Mercaptoäthanol
pH-Wert 7.3

18. 12. 80
22.

- 1 versetzt und in bekannter Weise die Extinktion bei
einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Es zeigte sich,
daß die ohne äußere mechanische Durchmischung in der
Schwebe gehaltenen Latexpartikel ein um etwa 11 %
5 verringertes Signal ergeben.

- Nachdem auf diese Weise die T_4 -Eichkurven ermittelt wur-
den, wurden anschließend in derselben Weise Bestimmungen
10 durchgeführt, bei denen anstelle von 100 μ l T_4 -Standard-
serum jeweils 100 μ l von Proben unbekannten T_4 -Gehalts
eingesetzt und die Extinktion der B-Phasen nach der
Resuspendierung in Substratlösung gemessen werden.

- 15 Es wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel
als Träger für Antikörper und auch Antigene hervorragend
geeignet sind und deren Immunreaktivität nicht beein-
trächtigen. Sie können daher mit großem Vorteil bei solid-
20 face-Enzymimmunotesten als Träger eingesetzt werden. Weiter
wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel in
Puffermilieu über lange Zeit hinweg in der Schwebe bleiben,
daß die Dichte der Partikel also etwa gleich eins ist.
Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen hydrophilen
25 Latexpartikel gut zentrifugierbar und resuspendierbar,
ohne an Immunreaktivität einzubüßen.

Beispiel 13

- 30 Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung von Human-
Thyreotropin (TSH)
-

- Die Bestimmung von TSH in Humanserum ist von erheblicher
Bedeutung für die Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen.
35 Eine primäre Hypothyreose erkennt man an einer stark
erhöhten Basal-TSH-Konzentration (10 bis 100 μ U TSH/ml).
Darüber hinaus kann eine Hyperthyreose mit Sicherheit
dann ausgeschlossen werden, wenn der TSH-Basalwert im

19 10 00
23.

- 1 Serum von 0,5 bis 3 $\mu\text{U/ml}$ nach Stimulation mit TRH
(Thyroidea-releasing-hormon) nicht ansteigt. Steigt der
TSH-Wert dagegen um mindestens 2,5 $\mu\text{U/ml}$, jedoch um nicht
mehr als 25 $\mu\text{U/ml}$, dann ist der Schilddrüsen-Stoffwechsel
5 mit hoher Wahrscheinlichkeit ungestört. Ein Anstieg um
mehr als 25 $\mu\text{U/ml}$ von einem mehr oder weniger leicht er-
höhten Basalwert läßt auf eine latente präklinische
Hypothyreose schließen. Es sind bereits Enzymimmunoassays
für TSH bekannt (Clinica Chemica Acta 67, 263 - 268 (1976);
10 enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs,
herausgegeben von S.B. Pal, Walter de Gruyter, Berlin und
New York, 1978, S. 327 - 337; Analytical Biochemistry 96,
419 - 425 (1979)). Diese bekannten Bestimmungsmethoden
benötigen jedoch übermäßig lange Inkubationszeiten (bis
15 zu 5 Tage), sind unempfindlich (5 μU TSH/ml) oder setzen
aufwendige Meßgeräte voraus (Fluorometer oder Lumino-
meter), wobei außerdem eine Vorrichtung zum Mischen der
Ansätze erforderlich ist.
- 20 Die Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latex-
partikel ermöglicht nun eine photometrische Bestimmung
des TSH in einer Gesamtinkubationszeit von nur 2 1/2
Tagen nach der Doppelantikörper-Trenntechnik. Dabei wird
der zweite Antikörper an die erfindungsgemäßen hydro-
25 philen Latexpartikel kovalent gebunden. Die gebundene
Enzymaktivität wird dann nach einer B/F-Trennung gemessen.
Da die Latexpartikel eine Dichte aufweisen, die nicht
wesentlich höher als diejenige von Wasser ist, bleiben
sie auch während der Enzymreaktion in der Schwebe, wo-
30 durch das übliche Mischen entfällt. Bei Verwendung von
sehr verdünnten Latexsuspensionen, die aufgrund der hohen
Beladbarkeit mit Antikörpern ohne weiteres möglich ist,
entfällt auch das Zentrifugieren der Partikel nach Ablauf
der Enzymreaktion, da durch die Suspension hindurch
35 photometrisch gemessen werden kann.

20 15 12 80
24.

1 Im Gegensatz zu den üblicherweise in immunologischen
Testverfahren verwendeten Latices lassen sich die anti-
körperbeladenen, erfindungsgemäßen hydrophilen Polyglycidyl-
methacrylatpartikel nach dem Zentrifugieren leicht re-
5 suspendieren. Aus demselben Grund zeigt sich eine sehr
geringe nichtspezifische Adsorption des enzymmarkierten
Antigens (gebundene Aktivität in Abwesenheit vom primären
Antikörper).

10 Versuchsdurchführung

0,2 ml TSH-Standard (internationales Referenzpräparat
MRC 68/38 in TSH-freiem Serum) werden mit 0,1 ml einer
1:150000 Verdünnung in Wasser oder geeigneter Puffer-
15 lösung eines an sich bekannten Anti-TSH-Antiserums, bei-
spielsweise von Meerschweinchen, inkubiert. Nach 12 Stunden
werden 0,1 ml einer Lösung eines Enzymkonjugats, bestehend
aus an Glukoseoxidase (GOD) kovalent gekoppeltem TSH (ent-
sprechend ca. $1,5 \times 10^{-9}$ g TSH), zu dem Gemisch der ersten
20 Stufe pipettiert. Zu diesem Gemisch werden nach weiteren
12 Stunden 0,1 ml einer Latexsuspension pipettiert. Die
Suspension enthält 0,1 bis 1 mg/ml Methacrylatlatex, wo-
bei - wie in Beispiel 11 beschrieben - pro 1000 mg der
trockenen Latexpartikel 5 bis 150 mg Protein einer Immun-
25 globulinfraktion, die aus einem Ziegenantiserum gegen
Meerschweinchen-IgG gewonnen wurde, hinzugefügt und so an
die hydrophilen Latexpartikel kovalent gebunden worden
sind. Nach einer Stunde wird zentrifugiert und der Nieder-
schlag der Latexpartikel mit 1 ml einer geeigneten Puffer-
30 lösung gewaschen, wodurch die Latexpartikel resuspendiert
werden. Anschließend wird erneut mehrfach zentrifugiert
und gewaschen. Die Überstände werden verworfen.

35

ORIGINAL INSPECTED

23.10.80
25.

1 Zu jedem Ansatz wird 1 ml einer Substratlösung für die
GOD pipettiert und kurz geschüttelt. Die Latexpartikel
bleiben danach mindestens 2 Stunden lang gleichmäßig
suspendiert. Danach wird die Suspension in eine Meß-
5 küvette überführt und die Extinktion bei 405 nm gemessen.
Von jeder Extinktion wird ein Substratleerwert L_1 abge-
zogen. L_1 ist die Extinktion von 1 ml Substratlösung,
die die gleiche Masse beladener Latexpartikel enthält
wie die oben erwähnte Latex-Suspension, die zu dem Ge-
10 misch aus Anti-TSH-Antiserum und TSH-GOD zugegeben
wurde.

Die so ermittelten Extinktionen werden für verschiedene
Standardkonzentrationen an TSH aufgezeichnet. Mit Hilfe
15 dieser Eichkurven werden die Konzentrationen von TSH
in klinischen Proben unbekannten Gehaltes anhand der er-
mittelten Extinktionen abgelesen.

Als geeignete Pufferlösung wird vorzugsweise eine 0,04 M
20 Phosphat-Lösung, pH 7,4, verwendet, die 0,005 M EDTA,
0,1 % Rinderserumalbumin sowie 0,15 M NaCl enthält.

Als GOD-Substratlösung wird bevorzugt eine wäßrige
Lösung eingesetzt, die 5 g/100 ml Glukose, 100 mg/100 ml
25 2,2'-Azino-di- β -ethyl-benzthiazolon-sulfonsäure(6) $\bar{7}$
(ABTS), 5 mg/100 ml Peroxidase (POD), 0,05 M Phosphat-
puffer, pH 5,6, enthält.

Zum Vergleich wurde der TSH-Gehalt dreier Serumproben
30 sowohl mit dem vorstehend beschriebenen EIA (A) als auch
mit Hilfe eines bekannten Doppelantikörper-RIA (B) be-
stimmt. Wie die folgende Tabelle zeigt, stimmen die je-
weils ermittelten Werte gut überein:

35

22 20.10.80
26

	(A)	(B)
1 Serum 1	11,2 μ U/ml	12,5 μ U/ml
5 Serum 2	7,3 μ U/ml	7,1 μ U/ml
Serum 3	3,8 μ U/ml	4,5 μ U/ml

- 10 Auch aus der vorstehend beschriebenen TSH-Bestimmung ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel als Träger für biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen, insbesondere für Antikörper hervorragend geeignet sind.

15

Ermittlung der unspezifischen Bindung

- Eine TSH-Standard-Probe wird in der oben unter "Versuchsdurchführung" beschriebenen Weise behandelt (Probe C) und mit einer weiteren gleichartigen Probe (Probe D) verglichen, die nahezu den identischen Umsetzungen wie Probe C unterworfen worden ist. Es wurde lediglich das Anti-TSH-Antiserum weggelassen. Der Vergleich der für die beiden Proben C und D in der Suspension gemessenen Extinktionen

25

	Probe C	Probe D
Extinktion gemessen in der Suspension abzüglich L_1	1,028	0,015

30

zeigt, daß die unspezifische Bindung weniger als 1,5 % beträgt.

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.